Revue suisse Zool.	Tome 86	Fasc. 4	p. 817-821	Genève, décembre 1979

Auftrennung der RNS in den Paragonien von *Drosophila* mittels Gradienten-Formamidgel-Elektrophorese.[1]

von

P. S. CHEN

Mit 2 Abbildungen

ABSTRACT

Separation of paragonial RNAs in *Drosophila* by gradient formamide gel electrophoresis. — The *in vitro* pulse labeled RNAs in the paragonial gland from mated and unmated adult males of *Drosophila melanogaster* were separated on 3.5-5% gradient polyacrylamide slab gels in formamide. At least 60 radioactive RNA bands have been observed by fluorography. Several lines of evidence indicate that most of these bands must be mRNAs. From densitometrical quantitation of the fluorograms it is concluded that the coordinated synthesis of individual proteins in the depleted glands following copulation is correlated with a coordinated synthesis of the corresponding messages.

EINLEITUNG

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die biochemischen Grundlagen der Fortpflanzung bei *Drosophila* erweisen sich die Paragonien (Anhangsdrüsen) der adulten Männchen als besonders interessant. Ausser Aminosäuren, Peptiden und weiteren Derivaten enthält das Sekret dieser Drüsen zahlreiche Proteine, die für die Übertragung und Befruchtung der Spermien unentbehrlich sind (für Literatur siehe FOWLER 1973; CHEN 1971, 1978). Nach jeder Begattung müssen die sekretorischen Proteine neu synthetisiert werden. Es stellt sich die Frage, ob die Bildung dieser Proteine mit der Synthese

[1] Ausgeführt mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

Vortrag gehalten an der Jahresversammlung der SZG In Zürich, 2.-3. März 1979.

der einzelnen messenger-Ribonukleinsäuren (mRNS) korreliert ist. Wegen der Heterogenität der RNS in den sekretorischen Zellen haben wir die sogenannte Formamidgel-Elektrophorese für die Analyse gebraucht. Das elektrophoretische Muster der adulten Männchen vor der Begattung wird mit demjenigen der Fliegen nach der Begattung verglichen. Als Kontrolle für die Spezifität der angewandten Methode wurden Paralleluntersuchungen an Speicheldrüsen und Fettkörpern des 3. Larvenstadiums durchgeführt. Es handelt sich hier um eine vorläufige Mitteilung. Einzelheiten sollen in einer späteren Publikation veröffentlicht werden.

MATERIAL UND METHODEN

Adulte Fliegen des Wildstamms „Sevelen" von *Drosophila melanogaster* wurden auf Standardfutter bei 25° C aufgezogen. Die Männchen wurden unmittelbar nach dem Schlüpfen von den Weibchen isoliert.

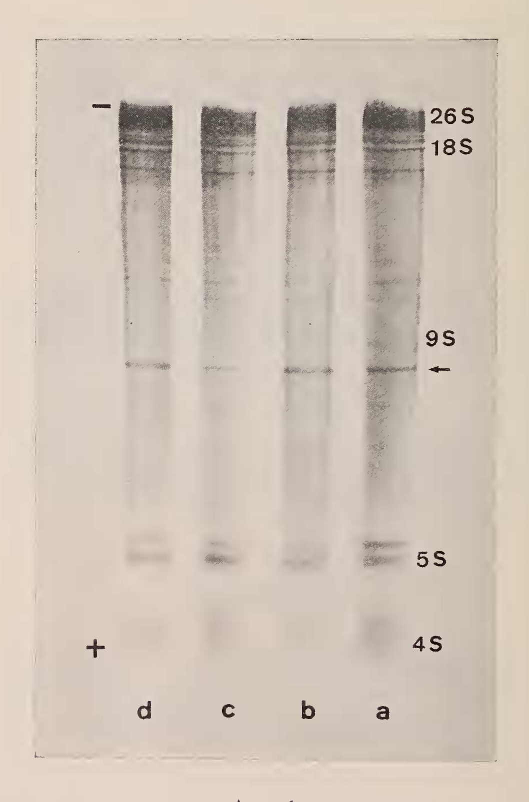


Abb. 1.

Elektrophoretische Auftrennung der ^{3}H-markierten Paragonien-RNS auf einer 3,5—5%igen Gradienten-Formamidgelplatte. Die Expositionszeit des Fluorogramms betrug 2 Tage bei −90°C. (a) Unbegattete Männchen; Menge der aufgetragenen Radioaktivität: $1{,}9 \times 10^{5}$ cpm. (b-d) Männchen 2, 4 und 24 h nach der Kopulation; Menge der aufgetragenen Radioaktivität: $2{,}5-3{,}2 \times 10^{5}$ cpm. Die Mobilität der einzelnen Banden ist durch die Lage der RNS-Marker (26-4 S) angedeutet.

Für die Begattung brachten wir eine männliche Fliege im Alter von 10 Tagen sowie ein virginelles Weibchen in einen Glastubus. Nach der ersten Kopulation wurde das Weibchen zweimal durch ein frisches virginelles Weibchen ersetzt. Die Paragoniendrüsen der Männchen nach dreimaliger Kopulation waren praktisch leer. Es wurden 15 solche Drüsen herausseziert und in 5 μl Pufferlösung (pH 7,0) mit ^{3}H-markierten Uridin, Cytidin, Adenosin und Guanosin (spezifische Radioaktivität 6,4—52 Ci/mM, 10 μCi/μl, The Radiobiochemical Centre, Amersham) während 30—60 min bei 25° C inkubiert.

Die genauen Angaben über die Phenolextraktion der markierten RNS sowie die Zusammensetzung der Stammlösungen für die Herstellung des Formamidgels befinden sich in Mitchell *et al.* (1978). Um die elektrophoretische Auflösung der einzelnen RNS-Banden zu erhöhen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein 3,5—5%iges Gradientengel benützt. Die fluorographische Auswertung der Gelplatten (0,17 × 10 × 11 cm) erfolgte nach dem Verfahren von Bonner & Laskey (1974).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Infolge der Anwesenheit des Formamids im Polyacrylamidgel, werden sowohl die sekundäre Struktur als auch die Aggregation der RNS-Moleküle vollständig eliminiert (Staynov *et al.* 1972). Nach dieser Denaturierung bewegen sich die verschiedenen RNS-Typen während der Elektrophorese rein nach ihrem Molekulargewicht. Dies erleichtert die Auftrennung der besonders heterogenen Kern-RNS sehr. Unsere bisherige Erfahrung zeigt, dass mittels der von uns verwendeten Gelkonzentration RNS mit Sedimentationskonstanten von 4 S bis 28 S aufgetrennt werden können.

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, sind im Extrakt der Paragoniendrüsen nach der in vitro-Markierung mindestens 60 radioaktive RNS-Banden fluorographisch feststellbar. Die Gelregion von ca. 26 S zeigt eine sehr hohe Radioaktivität und enthält wahrscheinlich heterogene Kern-RNS, die bei *Drosophila* ein durchschnittliches Molekulargewicht von 1,4 × 10^6 Daltons besitzt (Lengyel & Penman, 1975). Die zwei Banden im Bereich von 18 S sind auf die Akkumulation von ribosomalen RNS zurückzuführen. Kurz vor dem 9 S RNS-Marker in der Anodenrichtung befindet sich eine sehr scharfe, schmale Bande (siehe Pfeile in Abb. 1 und 2). Da ihre Markierung durch Äthidiumbromid (4 μg/μl) nahezu vollständig gehemmt wird (Fluorogramm hier nicht gezeigt), handelt es sich bei dieser Bande wahrscheinlich um mitochondriale mRNS. Die Lokalisation der 5 S rRNS und 4 S tRNS im Bereich des Niedermolekulargewichts ist deutlich.

In Übereinstimmung mit unserem früheren Befund (Von Wyl & Chen 1974) stellten wir eine 20%ige Zunahme im Totaleinbau der ^{3}H-Nukleoside in die RNS der Paragoniendrüsen nach der Begattung fest. Die densitometrische Auswertung der Fluorogramme bewies, dass die Synthese der vorwiegenden RNS in den begatteten Männchen proportional erhöht wird (Abb. 2). Dies deutet auf eine korrelierte Synthese der Proteine und der mRNS hin. Von besonderem Interesse ist das Verhältnis zwischen der reifen 5 S RNS und ihrem Vorläufer 5 S^+ RNS. Nach der Kopulation ist die Radioaktivität der 5 S Bande viel höher als diejenige der 5 S^+ Bande, während dies umgekehrt der Fall ist vor der Kopulation (Vergl. Abb. 2*a* und 2*b*).

Unsere Untersuchung der larvalen Speicheldrüsen und des Fettkörpers unter den gleichen Bedingungen bestätigte, dass das oben beschriebene elektrophoretische Muster spezifisch ist für die Paragonien. Ausserdem ergab die Affinitätschromatographie mit Poly(U)-Sepharose, dass zahlreiche RNS Banden Poly(A)-Sequenzen aufweisen. Demnach muss es sich bei diesen Banden um mRNS handeln. Die von uns ausgearbeitete elektrophoretische Methode hat eine hohe Empfindlichkeit und ein grosses Auflösungs-

vermögen; sie eignet sich besonders für die Analyse des RNS-Stoffwechsels in den differenzierten Zellen und Geweben von Insekten, bei denen das verfügbare Untersuchungsmaterial meist sehr beschränkt ist.

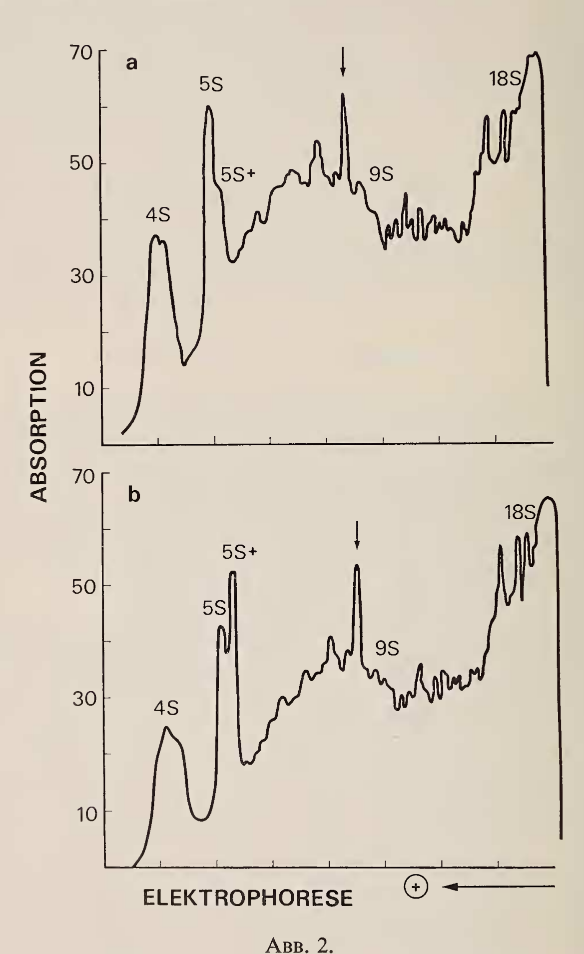


ABB. 2.

Densitometrische Auswertung des Fluorogramms mit einem Densitometer DD2 und einem Schreiber DB5 der Firma Kipp & Zonen. Die Expositionszeit betrug 24 h bei −90°C. (a) RNS aus Männchen 6 h nach der Kopulation; Totalradioaktivität: 1,6 × 10^5 cpm. (b) RNS aus unbegatteten Männchen; Totalradioaktivität: 1,4 × 10^5 cpm.

LITERATUR

BONNER, W. M. and R. A. LASKEY. 1974. A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83-88.

CHEN, P. S. 1971. Biochemical Aspects of Insect Development. *Karger, Basel.*

— 1978. Protein synthesis in relation to cellular activation and deactivation. In "Biochemistry of Insects" (M. ROCKSTEIN, ed.), pp. 145-203. *Academic Press, New York.*

FOWLER, G. L. 1973. Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila:* Sperm transfer, sperm storage and sperm utilization. *Adv. Genet.* 17: 293-360.

LENGYEL, J. and S. PENMAN. 1975. hnRNA size and processing as related to different DNA content in two dipterans: *Drosophila* and *Aedes. Cell* 5: 281-290.

MITCHELL, H. K., P. S. CHEN, L. S. LIPPS and G. MOLLER. 1978. Separation of *Drosophila* RNAs on acrylamide gels in formamide. *Insect Biochem.* 8: 29-35.

STAYNOV, D. Z., J. C. PINDER and W. B. GRATZER. 1972. Molecular weight determination of nucleic acids by gel electrophoresis in non-aqueous solution. *Nature, New Biol.* 235: 108-110.

VON WYL, E. und P. S. CHEN. 1974. Paragonienproteine der Adultmännchen von *Drosophila melanogaster:* Elektrophoretisches Muster und in vitro-Synthese. *Revue suisse Zool.* 81: 655-662.

Anschrift des Verfassers:

Zoologisches Institut der Universität
CH-8057 Zürich